

| | | | |
|---------------|--|----|-------------|
| 所属 (主指導教官) | 生体高分子構造学講座 (箱嶋敏雄) | | |
| 氏名 | 真板 宣夫 | 提出 | 平成14年 1月 8日 |
| 題目 | Crystal structures of rat GTP cyclohydrolase I complexed with its feedback regulatory protein GFRP (ラット GTP シクロヒドロレーズ I とそのフィードバック調節蛋白質 GFRP との複合体の結晶構造) | | |
| 要旨 | <p>ドーパやセロトニン、一酸化窒素などの神経伝達物質の生合成には共通してテトラヒドロbiopterin (BH₄) が補因子として関与している。そのため BH₄ の生合成経路に支障があると様々な神経障害が引き起こされる。哺乳類の生体では BH₄ は GTP から 3 種類の酵素反応を経て合成されるが、GTP cyclohydrolase I による GTP からジヒドロネオopterin三リン酸 (NH₂P₃) を合成する最初の反応が全体の律速となっている。GTPCHI はそれ単独でも活性を持つが、哺乳類では GTPCHI Feedback Regulatory Protein (GFRP) という調節因子と複合体を形成し、フィードバック調節を行っていることが知られている。複合体には活性型と不活性型の二種類があり、活性型は L-フェニルアラニン (Phe) が、不活性型は GTP と BH₄ がそれぞれリガンドとなる。本研究では GTPCH-GFRP 複合体の調節機構・リガンド結合様式・複合体形成機構を明らかにする目的で、GTPCH-GFRP 複合体の構造を X線結晶構造解析の手法を用いて行った。</p> <p>精製したラット GTPCHI および GFRP をリガンド存在下で結晶化し、活性型・不活性型それぞれ 2.8 Å の分解能で構造決定した。GTPCH-GFRP 複合体は、GTPCHI 五量体リングが上下二つ重なった十量体の上下に GFRP 五量体が結合し、高さおよそ 130 Å、胴の直径 93 Å の提灯型構造をしていた。GTPCHI 部分は今までに知られているヒトのものとはほぼ同じ構造であったが、GFRP は ββαββαβ トポロジーを持つ新規構造であった。GFRP の五量体構造は β-プロペラと呼ばれるドメイン構造に類似していた。GFRP はリングの内側と外側二つの GTPCHI との接触領域を持ち、GFRP 一分子が GTPCHI 二分子を架橋するような形で結合していた。リガンド分子は Phe, BH₂ どちらも GTPCHI と GFRP の境界に結合しており、Phe 結合部位は GFRP の二サブユニットの境界、逆に BH₂ 結合部位は GTPCHI の二サブユニットの境界に位置していた。活性型複合体で Phe 結合に関与する GTPCHI の残基は Glu²²⁷ のみで、この残基が活性型複合体形成に重要であると示唆された。どちらのリガンドも GTPCHI と GFRP の接触面積を著しく増大させることにより、これが複合体形成を促進することが明らかとなった。</p> <p>活性型と不活性型でそれぞれ構造を比較してみると、GFRP にはあまり大きな変化が見られないのに対し、GTPCHI は四次構造の変化が見られたが、活性中心の残基及び亜鉛イオンの相対的位置は大きな変化は見られなかった。GTPCHI の構造変化は主に BH₂ の結合によって引き起こされ、活性部位近傍の 106-115 が大きく変化していた。特に Phe¹¹³ が活性調節の際に活性部位の蓋のように機能することが推測された。同時に GTP 結合部位の Leu¹⁵⁶ が不活性型ではグアニン結合部位を狭めるように変化しており、</p> | | |

これは GTPCHI 単独での構造に近かった。以上のことから、GTPCH-GFRP の活性調節機構を次のように推測した。GTPCHI 単独ではもともと活性型構造であるが、Phe 存在下で GFRP と結合するとこの構造が固定され、Leu¹⁵⁶ が GTP 結合部位を拡げるように変化して活性が上昇する。この状態では GTP 結合部位は Phe¹¹³ によって蓋をされる。不活性型では BH₂ の結合により GTPCHI の 106-115 が大きく構造変化を起こし、GTP 結合部位が大きく開いた状態になると同時にグアニン結合部位が狭まることにより、反応が阻害される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 真板 宣夫

平成14年1月8日に提出された論文は、神経伝達物質カテコールアミン類の生合成などに重要な補酵素であるテトラヒドロビオプテリン (BH4) の生合成の初発律速酵素であり、ジストニアなどの病因酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I (GTPCHI) とそのフィードバック制御蛋白質である GFRP との活性促進型複合体、ならびに活性阻害型複合体の X 線結晶解析の方法を用いた三次元構造決定とその構造に基づいた分子機能のメカニズムの解明からなる。

三次元構造決定では、試料の十分な精製、良質な結晶の調製、高分解能の観測強度データの収集、水銀を用いた重原子同型置換法、セレノメチオニン導入によるセレン原子を用いた多波長異常分散法ならびに分子置換法とを併用した位相決定、精度の高い三次元構造の精密化がなされており、技術的信頼性は高い。蛋白質の X 線による原子レベルの三次元構造決定とは、蛋白質の発現や精製などの生化学実験から、X 線強度データ収集などの物理実験、そして位相決定や構造解析における数値計算を含んでいるが、それらの全ての方法について十分な実力を有するものと判断した。

分子機能とそのメカニズムについては、その精度の高い三次元構造に基づいて詳細な構造学的な議論と、多くの関連した酵素学および臨床学データを引用した機能についての慎重な考察の結果として結論されており、十分な妥当性が認められる。これらは、GTPCHI と GFRP との結合部位の同定、正のフィードバック制御エフェクターであるフェニルアラニン (Phe) の結合部位の同定、負のフィードバック制御エフェクターであるジヒドロビオプテリン (BH2) の結合部位の同定、それら部位での相互作用と構造変化の詳細、ならびに、活性促進型複合体と活性阻害型複合体との比較による酵素活性制御メカニズムの解明である。

また、論文全般において、記述も水準に達していると判断された。

以上のように、本論文は GTPCHI の構造生物学に貴重な基礎データを提供するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。